

No active trail

**DELPHION**

Alerts

Step Track

RESEARCH

PRODUCTS

INSIDE DELPHION

Log Out Work Files Saved Searches

My Account


Search: Quick/Number Boolean Advanced Derwent

**Derwent Record**

✉ Email this to

View: [Expand Details](#) Go to: [Delphion Integrated View](#)Tools: Add to Work File: [Create new Work File](#)

Derwent Title: **New protein immobilized at solid phase by binding site, useful for detecting antibodies, comprises multiple antigen/epitope sequences for antibodies, spaced by bridge compositions so that they are exposed for antibody binding**

Original Title:  **EP1229044A1: Protein having multiple antigen/epitope sequences and being immobilized for the diagnosis of HIV infections**

Assignee: **GAIFAR GERMAN AMERICAN INST APPLIED BIOM Non-standard company**

Inventor: **BUDDE E; NICOLAUS S; REPKE H;**

Accession/Update: **2002-610375 / 200432**

IPC Code: **A61K 39/12 ; C07K 14/16 ; C07K 17/00 ; A61K 38/00 ; A61K 39/21 ; C07K 2/00 ; C07K 4/00 ; C07K 5/00 ; C07K 7/00 ; C07K 14/00 ; C07K 16/00 ; C07K 17/12 ; G01N 33/569 ;**

Derwent Classes: **B04; D16; S03;**

Manual Codes: **B04-E03F**(Encoding other protein/polypeptide) , **B04-E03H**(Encoding fusion protein) , **B04-E08**(Vectors, plasmids, cosmids, transposons) , **B04-F10A3E**(Escherichia (genetically engineered)) , **B04-F11**(Viruses) , **B04-G01**(Antibody defined in terms of antigen general and other) , **B04-N0400E**(Protein/polypeptide of undefined origin (no sequence) (genetically engineered)) , **B04-N08**(Fusion protein) , **B11-C07A**(Antigen - antibody reaction [general]) , **B12-K04A4**(Diagnosis of microbial infections) , **D05-C12**(Specific proteins by fermentation [excluding enzymes]) , **D05-H09**(Testing and detection [exc. bacteria, fungi, viruses]) , **D05-H10**(Fixing biological substances or cells to a carrier and the carriers themselves) , **D05-H11**(Antibodies) , **D05-H12A**(Wild-type coding sequences) , **D05-H12C**(Fusion genes, transgenes) , **D05-H12E**(Vectors) , **D05-H14A1**(Recombinant bacteria) , **D05-H17A6**(Production of other specified wild-type protein) , **D05-H17C**(Fusion protein/polypeptide production) , **S03-E14H4**(Immunoassay)

Derwent Abstract: **(EP1229044A) Novelty** - A protein (I) having multiple antigen/epitope sequences (AESs) for antibodies, and immobilized at a solid phase by at least one binding site, and AESs are spaced by bridge compositions in such a way that after binding of the binding site at the solid phase, AESs are exposed for a binding of the assigned antibodies from the liquid phase, is new.

**Detailed Description** - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

- (1) a polynucleotide (II), in particular cDNA, coding for (I);
- (2) an expression vector (III), preferably a plasmid, containing (II);
- (3) a cell which is transformed by means of (III); and
- (4) producing (I).

**Use** - (I) is useful for the production of an immobilizate for the detection of antibodies, where the protein is produced in a dissolved-manner, and then is bound by at least one binding site to a solid phase, and as an option, the solid phase with the bound protein is subjected to at least one rinsing step and/or blocking step. (I) is also useful for performing a human immunodeficiency virus (HIV) test, where an immobilizate is produced and placed in a housing, and a detector solution is brought-in in a reaction zone of the immobilizate or is

BEST AVAILABLE COPY

separately added for application to the immobilize (added).

**Advantage** - (I) is useful for a rapid test of the presence of antibodies in a patient's sample and reliably permits in such a rapid test, a detection of many to all groups and subtypes of a causative agent or of antibodies against it. Application of a mixture of antigens can be avoided by that the antigens/epitopes are combined in a single protein. Then an immobilization can take place easily without different affinities to the solid phase and/or interactions of different antigens between each other leading to disturbing displacements of the distributions.

Dwg.0/0

Family:

PDF Patent	Pub. Date	Derwent Update	Pages	Language	IPC Code
<b>EP1229044A1</b> *	2002-08-07	200266	17	English	C07K 14/16
Des. States: (R) AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI TR					
Local appls.: <u>EP2002000090043</u> Filed:2002-01-30 (2002EP-0090043)					
<b>US20030082208A1</b> =	2003-05-01	200331	84	English	A61K 39/12
Local appls.: <u>US2002000059271</u> Filed:2002-01-31 (2002US-0059271)					
<b>AU2308275A1</b> =	2002-10-03	200432		English	C07K 14/16
Local appls.: Based on WO00274797 (WO 200274797) AU2002000308275 Filed:2002-01-30 (2002AU-0308275)					
<b>WO0274797A2</b> =	2002-09-26	200273		English	C07K 14/16
Des. States: (N) AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH CN CO CR CU CZ DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ OM PH PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TN TR TT TZ UA UG UZ VN YU ZA ZM ZW (R) AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW MZ NL OA PT SD SE SL SZ TR TZ UG ZM ZW					
Local appls.: <u>WO2002EP0000924</u> Filed:2002-01-30 (2002WO-EP00924)					
<b>DE10106295C1</b> =	2002-08-22	200266	18	German	C07K 17/00
Local appls.: <u>DE2001001006295</u> Filed:2001-02-02 (2001DE-1006295)					

INPADOC  
Legal Status:

[Show legal status actions](#)

First Claim:  
[Show all claims](#)

1. A protein having multiple antigen/epitope sequences for antibodies, wherein the protein is immobilized at a solid phase by at least one binding site, and the antigen/epitope sequences are spaced by bridge compositions in such a way that after binding of the binding site at the solid phase the antigen/epitope sequences are exposed for a binding of the assigned antibodies from the liquid phase.

Priority Number:

Application Number	Filed	Original Title
DE2001001006295	2001-02-02	

Chemical  
Indexing Codes:

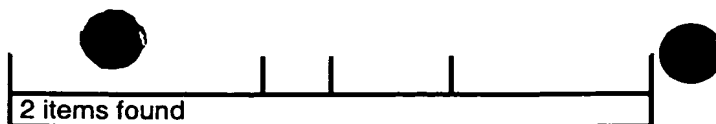
[Show chemical indexing codes](#)

Specific  
Compound  
Numbers:

[Show specific compounds](#)

Related  
Accessions:

Accession Number	Type	Derwent Update	Derwent Title
C2002-172771	C		
N2002-483363	N		



⌘ Title Terms: NEW PROTEIN IMMOBILISE SOLID PHASE BIND SITE USEFUL DETECT ANTIBODY  
COMPRISE MULTIPLE ANTIGEN EPITOPE SEQUENCE ANTIBODY SPACE BRIDGE  
COMPOSITION SO EXPOSE ANTIBODY BIND

[Pricing](#) [Current charges](#)

**Derwent Searches:** [Boolean](#) | [Accession/Number](#) | [Advanced](#)

Data copyright Thomson Derwent 2003

**THOMSON**

Copyright © 1997-2005 The Thomson Corp

[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [Help](#)



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 Patentschrift  
10 DE 101 06 295 C 1

51 Int. Cl.<sup>7</sup>:  
C 07 K 17/00

21 Aktenzeichen: 101 06 295.8-41  
22 Anmeldetag: 2. 2. 2001  
43 Offenlegungstag: -  
45 Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 22. 8. 2002

DE 101 06 295 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

73 Patentinhaber:  
GAIFAR German-American Institute for Applied  
Biomedical Research GmbH, 14473 Potsdam, DE  
74 Vertreter:  
Albrecht, Lücke & Jungblut Patentanwälte, 14195  
Berlin

72 Erfinder:  
Repke, Heinrich, Dr., 14089 Berlin, DE; Budde,  
Eckhard, Dr., 10997 Berlin, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:  
US 49 25 784

54 Protein mit mehreren Antigen-Epitop-Sequenzen, welches immobilisiert ist

57 Die Erfindung betrifft ein Protein mit mehreren Antigen-Epitop-Sequenzen für Antikörper, wobei das Protein an einer Festphase über zumindest eine Bindungsstelle immobilisiert ist, und wobei die Antigen-Epitop-Sequenzen über Brückenverbindungen mit der Maßgabe beabstandet sind, daß nach Bindung der Bindungsstelle an der Festphase die Antigen-Epitop-Sequenzen für eine Bindung der zugeordneten Antikörper aus der flüssigen Phase exponiert sind.

4. Beispielpolypeptid aus der Permutationstabelle (A, B und C) und andere (D und E)

A. pol 2 A 100/40, 140/33, 163/14 (131/2, 106/3) (253 AS)

WFLGIDKAGSIEKRYKSNRNASDPLRNGPKKARDI ECKNRKRVKAGVYKRLTVA RCHVQGLGSMAGQVDCSPGIMQLGCTNLEQVYLVKRV  
ASGTLADYIIPADPGCTAYDCCI EUPYDORRSGKSYACIGQKAVFIINTFRCGLCTYKAGDI VOIATDITRISQGLTQIKETFTYKQKRP  
LKEFPALJNKGECVAVIQRSDIKVVPKRAKEL IRTDCKKQKQDCVABRQSD

B. env 2 A 47/25, 210/5, 215/25, 240/23, 286/58, 344/48 (215/11) (232 AS)

MSDRKQKRSKEIYKRVYVTEPLGVAFTKRAVVOIKRAVIGSRLLAGI VQOORNLRAI ENQOHLGLTYHIGLOARILAVERTLKOQGL  
GIKSGSGLICTYAVPRKANDRSLGQIHNHTYKSGHRLINVTLLIKSLISESQWQKAMQELLEKORALNWFYIYKLAVENTLADQALE  
SNGCATPVCIDQPFSTESAGTERHDSIKLW

C. env 2 A 47/25, 210/5, 215/25, 240/23, 286/58, 344/48 (215/11) (234 AS)

MSDRKQKRSKEIYKRVYVTEPLGVAFTKRAVVOIKRAVIGSRLLAGI VQOORNLRAI ENQOHLGLTYHIGLOARILAVERTLKOQGL  
GIKSGSGLICTYAVPRKANDRSLGQIHNHTYKSGHRLINVTLLIKSLISESQWQKAMQELLEKORALNWFYIYKLAVENTLADQALE  
SNGCATPVCIDQPFSTESAGTERHDSIKLW

D. AS (N) + Seq 1D (1+37+24+38+2+37+32+38+3+37+27+38+2+37+25+38+11) (297 AS)

WCKRKRSKIKKVTGKAGVIGICTYKPNSTKRSVAGI GPOGFATGDI IGOIDAKNCHIGPTPTCFKORNLKERTYKSDQKAGVIGICTYKPN  
WTFKSIKSGKAFATSGSLIGDI KQAKHIGIPTPTCHVPRNGKRSKRYKTCVWAGISICTYKPNSTKRSVAGI GPOGFATGDI IGOIDAKNCHIGPTPTCFKORNLKERTYKSDQKAGVIGICTYKPN  
KQAKHIGIPTPTCHVPRNGKRSKRYKTCVWAGISICTYKPNSTKRSVAGI GPOGFATGDI IGOIDAKNCHIGPTPTCFKORNLKERTYKSDQKAGVIGICTYKPN  
T. env 4 (221 AS)

MSDRKQKRSKEIYKRVYVTEPLGVAFTKRAVVOIKRAVIGSRLLAGI VQOORNLRAI ENQOHLGLTYHIGLOARILAVERTLKOQGLIGKSGSGLICTY  
AVPRKANDRSLGQIHNHTYKSGHRLINVTLLIKSLISESQWQKAMQELLEKORALNWFYIYKLAVENTLADQALE SNGCATPVCIDQPFSTESAGTERHDSIKLW

DE 101 06 295 C 1

- 5 [0001] Die Erfindung betrifft ein Protein mit mehreren Antigen-Epitop-Sequenzen, welches immobilisiert ist, eine für ein solches Protein codierende Polynukleotide, einen Expressionsvektor enthaltend solche Polynukleotide, eine mittels eines solchen Expressionsvektors transformierte Zelle, sowie Verwendungen eines solchen Proteins zur Herstellung eines Immobilisats und zur Herstellung eines HIV-Tests.

#### 10 Hintergrund der Erfindung

[0002] Immobilisate aufweisend eine feste Phase und ein oder mehrere an der festen Phase gebundene Proteine sind vielfältig aus der Praxis bekannt. Solche Immobilisate werden einerseits zum Nachweis von an das Protein spezifisch bindenden Substanzen eines flüssigen Analysats und andererseits zur Abtrennung solcher Substanzen aus einer Flüssigkeit eingesetzt. Dabei weist das Protein ein Epitop auf, welches für die nachzuweisende oder abzutrennende Substanz spezifisch ist, und dieses Epitop ist in der Regel über eine Spacerverbindung, die als solche nicht an die Substanz bindet, an die feste Phase gebunden. Die Spacerverbindung gewährleistet u. a., daß das Protein sich im Bereich des Epitops in einer Weise faltet, die der Faltung des nativen Epitops entspricht. Dies, i. e. die gewünschte Exponierung des Epitops, ist die Voraussetzung dafür, daß eine Bindung der Substanz überhaupt möglich ist. Insbesondere wird die Ausbildung unerwünschter Disulfidbrücken verhindert.

[0003] In manchen Bereichen der Medizin ist es wünschenswert, wenn verschiedene Epitope gleichzeitig an der festen Phase immobilisiert sind. Dies ist beispielsweise im Falle von HIV-Tests wünschenswert, da nur eine Ansammlung von Epitopen, welche für Antikörper für verschiedene HIV1 und HIV2 Stämme und Subtypen spezifisch sind, eine zuverlässige Aussage auf Basis des Testergebnisses darüber gewährleisten, ob die getestete Probe HIV Antikörper, welchen Subtyps auch immer, enthält oder nicht, i. e. ob eine Person HIV positiv ist oder nicht.

[0004] Grundsätzlich könnten die jeweiligen Proteine, beispielsweise Antigene gegen diverse HIV Antikörper, jeweils für sich an der festen Phase immobilisiert werden. Dies birgt jedoch verschiedene Probleme. Ein erstes Problem besteht darin, daß eine gleichmäßige Verteilung der Proteine, insbesondere hinsichtlich der Konzentrationen, und somit eine hinreichend gleichförmige Sensitivität für verschiedene Antikörper nicht gewährleistet werden kann. Denn verschiedene Proteine können zu Verdrängungsreaktionen an der festen Phase führen mit der Folge von in beachtlichem Maße störenden Konzentrationsunterschieden an der festen Phase, auch bei äquimolarem Auftrag. Weiterhin sind bei einer höheren Vielzahl von verschiedenen Proteinen Wechselwirkungen der verschiedenen Proteine im Zuge der Immobilisierung nicht auszuschließen. All dies stört jedoch, wenn gleichsam ein Universaltest, beispielsweise auf HIV, hergestellt werden soll. Die vorstehenden Ausführungen treffen natürlich sinngemäß auf grundsätzlich alle Erkrankungen zu, die, je nach Klassen und Subtypen des infizierenden Organismus, immunologisch unterscheidbare Antikörper in einem Körper hervorrufen können. Es versteht sich, daß gegen einen spezifischen Subtyp auch unterschiedliche Antikörper gebildet sein können.

[0005] Im Zusammenhang mit HIV ist folgendes ergänzend anzumerken. Die erworbene Immunschwächekrankheit AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) wird durch das HIV verursacht. Die beiden bisher beobachteten Erregerstämme HIV-1 und HIV-2 haben eine sehr ähnlich Genomstruktur und infizieren T-Zellen über einen sehr ähnlichen Mechanismus. Sie unterscheiden sich aber immunologisch so weit, daß Antikörper gegen HIV-1 in der Regel keine Kreuzreaktion mit HIV-2 zeigen und umgekehrt. Bei HIV-1 werden zudem eine Reihe von Subtypen unterschieden, wobei die Gruppe M mehrere Subtypen umfaßt (A, B, C, D, E, F und G) und der Subtyp O in eine eigene Gruppe (Gruppe O) gestellt wird. Auch zwischen den Antikörpern gegen verschiedene Subtypen bestehen immunologische Unterschiede. Daher ist es schwierig, in einem einzigen Testsystem alle Subtypen, bzw. alle Antikörper hiergegen, zuverlässig zu erkennen. Dies gilt in besonderem Maße für Schnelltests, die ohne großen experimentellen Aufwand durchzuführen sein müssen. In einem Schnelltest sollte durch einmaligen Auftrag beispielsweise einer Blutprobe ein zuverlässiges Ergebnis erhaltbar sein. Insbesondere im Zusammenhang mit HIV müssen falsch negative und falsch positive Ergebnisse praktisch ausgeschlossen sein.

#### 50 Stand der Technik

[0006] Beispielhaft für den Einsatz eines oder mehrerer Antigene in Mischung gegen verschiedene HIV-Antikörper ist die Literaturstelle US-A-5,830,641.

55 [0007] Bisher bekannte Schnelltests arbeiten demgegenüber in der Regel mit einem einzigen Antigen, nämlich gp41, und sind daher nicht in der Lage, alle HIV-Subtypen zuverlässig und mit hoher Sensitivität zu erkennen. Es besteht also ein sehr beachtliches Risiko falsch negativer Ergebnisse. Sie sind zudem nicht über längere Zeit temperaturstabil, nicht für eine permanente Dokumentation geeignet, gewährleisten keine einfache und sichere Entsorgung und zeigen bei Überentwicklung ein falsch positives Ergebnis.

60 [0008] Fusionsproteine mit mehr als einem Epitop für HIV-Antikörper sind an sich bekannt beispielsweise aus den Literaturstellen US-A-5,800,822 und US-A-5,310,876. Hierbei handelt es sich um Proteine, die in Lösung im Rahmen von Labortests eingesetzt werden. Solche Labortestsysteme sind jedoch für Schnelltests aufgrund der komplexen Handhabung und dem bei Ausführung durch nicht ausgebildete Personen folglich hohen Risiko falscher Ergebnisse nicht geeignet.

65 [0009] Aus der Literaturstelle US-A-4,925,784 ist ein Fusionsprotein gag/env bekannt, welches auch immobilisiert sein kann. Brückenverbindungen mit Bindungsstellen für eine Bindung mit einer festen Phase zwischen gag und env sind nicht entnehmbar. Das Fusionsprotein ist einseitig über eine Brücke an einer festen Phase gebunden.

[0010] Aus der Literaturstelle DE 197 20 914 A1 sind verschiedene Antigene gegen Antikörper verschiedener Subty-

pen bekannt. Die Antigenen können an einer Festphase gebunden sein. Verschiedene Antigene werden als Gemisch eingesetzt. Sofern Antigen mit multiplen Epitopen angesprochen sind, so handelt es sich um Haptene, i. e. Proteine mit mehrfachen Sequenzen eines einzigen Epitop-Typs.

[0011] Die Literaturstelle US-A-5,241,047 beschreibt Peptide, welche mit Seren HIV-positiver Probanden reagieren. Dabei sind diverse Epitope unmittelbar aneinander gekoppelt und können über eine Spacersequenz am C- oder N-terminalen Ende an einer Festphase gebunden sein. Mittels einer Spacersequenz wird eine Beabstandung einer Signalsequenz von einem Trägermaterial erreicht. Ein Ende der Spacersequenz ist an das Trägermaterial und das andere an ein Ende der Signalsequenz gebunden. An jede Spacersequenz ist nur eine einzige Signalsequenz gekoppelt.

#### Technisches Problem der Erfindung

[0012] Der Erfindung liegt das technische Problem zugrunde, ein immobilisierbares Protein anzugeben, das für einen Schnelltest auf Vorliegen von Antikörpern in einer Patientenprobe eingesetzt werden kann und in einem solchen Schnelltest zuverlässig eine Erkennung vieler bis aller Gruppen und Subtypen eines Erregers bzw. von Antikörpern hiergegen erlaubt.

#### Grundzüge der Erfindung

[0013] Zur Lösung dieses technischen Problems lehrt die Erfindung ein Protein mit mehreren Antigen-Epitop-Sequenzen für Antikörper, wobei das Protein an einer Festphase über zumindest eine Bindungsstelle immobilisiert ist, und wobei die Antigen-Epitop-Sequenzen über Brückenverbindungen mit der Maßgabe beabstandet sind, daß nach Bindung der Bindungsstelle an der festen Phase die Antigen-Epitop-Sequenzen für eine Bindung der zugeordneten Antikörper aus der flüssigen Phase exponiert sind.

[0014] Die Erfindung beruht auf einer Kombination von Erkenntnissen. Eine erste Erkenntnis liegt darin, daß sich die Nachteile des Einsatzes einer Mischung von Antigenen dadurch vermeiden lassen, daß die Antigen-Epitope in einem einzigen Protein kombiniert werden. Dann kann eine Immobilisierung unschwer erfolgen, ohne daß unterschiedliche Affinitäten zur Festphase und/oder Wechselwirkungen verschiedener Antigene untereinander zu störenden Verschiebungen der Verteilungen führen. Hieran anschließend beruht die Erfindung auf der weiteren Erkenntnis, daß es nicht ausreicht, lediglich verschiedene Epitope aneinander zu reihen und dann das Produkt an einem Ende (oder beiden Enden) an der Festphase zu binden. Vielmehr muß erreicht werden, daß die Epitope nach der Immobilisierung in gewünschter Weise exponiert sind, i. e. eine Sekundär- und ggf. Tertiärstruktur bilden, die eine Bindung der zugeordneten Antikörper gewährleistet und zudem sterisch die Zugänglichkeit ermöglicht. Schließlich wurde erkannt, daß dies erreichbar ist, indem zwischen den Epitopen Brückenverbindungen eingerichtet werden, welche einerseits die Bindung an die Festphase bewirken und andererseits für die gewünschte Exponierung der Epitope sorgen. Das Konzept besteht also im Kern aus der Schaffung eines einzigen Proteins mit mehreren beabstandeten Epitopen, wobei die Epitope durch Zwischenschaltung der Brückenverbindungen wiederum gleichsam vereinzelt sind. Durch geeignete Wahl der Brückenverbindungen, insbesondere der Strukturen der beiseitig eines Epitops sich bis zu den beidseitigen Bindungsstellen an der Festphase erstreckenden Teile der jeweiligen Brückenverbindungen lassen sich zudem die Epitope auf definierte Weise falten, so daß die Exponierung sicher gewährleistet und zudem gleichsam fixiert ist. Schließlich ist der Konzeption der Erfindung inhärent, daß störende Wechselwirkungen verschiedener Epitope eines Proteins praktisch ausgeschlossen sind.

[0015] Geeignete Brückenverbindungen lassen sich nach Maßgabe der diese flankierenden Epitop Strukturen bzw. sequenzen mit den Mitteln des molecular modelling unschwer berechnen. Zusätzlich oder alternativ kann der Durchschnittsfachmann experimentell verschiedene Brückenverbindungen auf Eignung testen, indem die Bindungsfähigkeit von Antikörpern an die die Brückenverbindung flankierenden Epitope mit üblichen Methoden getestet wird.

[0016] Es versteht sich, daß ein erfindungsgemäßes Protein Enden besitzen muß. Ein Ende kann das Ende eines Epitops sein, welches weder direkt noch indirekt an die Festphase gebunden ist. Ein Ende kann weiterhin ein Ende einer Brückenverbindung sein, wobei das Ende der Brückenverbindung die Bindungsstelle sein kann oder, bezogen auf das angeschlossene Epitop, jenseits der Bindungsstelle liegen kann. Ein Ende kann schließlich auch durch ein Tag, insbesondere ein Affinitäts-Tag, gebildet sein.

[0017] Grundsätzlich gibt es verschiedene Möglichkeiten, ein erfindungsgemäßes Protein zu erstellen. Beispielsweise kann eine Brückenverbindung durch Insertion von Brückensequenzen zwischen zwei Antigen-Epitop-Sequenzen und/oder Deletion einer Teilsequenz zwischen zwei in einer Gesamtsequenz angeordneten Antigen-Epitop-Sequenzen gebildet sein. Die Brückenverbindung kann auch durch Fusion einer Brückensequenz mit zwei Antigen-Epitop-Sequenzen gebildet sein.

[0018] Als Brückenverbindungen kommen die verschiedensten Moleküle in Frage. Grundsätzlich können beliebige organische Substanzen, typischerweise kettenartige Verbindungen, eingesetzt werden. Als Beispiele sind Oligomere auf Basis gleichartiger oder verschiedenartiger Monomere der Polymerchemie zu nennen. Bevorzugt ist es, wenn die Brückenverbindung aus Aminosäuren gebildet ist. Die Brückenverbindung muß eine Bindungsstelle für die Festphase aufweisen. Üblicherweise wird hierfür eine positiv geladene Bindungsstelle zur Bindung an eine negativ geladene Festphase, vorzugsweise eine Membran, eingerichtet.

[0019] Grundsätzlich können die Antigen-Epitop-Sequenzen innerhalb des Proteins gleich sein. Besonders bevorzugt ist es jedoch, wenn die Antigen-Epitop-Sequenzen verschiedene Antikörper binden. Idealerweise werden solche verschiedenen Antigen-Epitop-Sequenzen in einem erfindungsgemäßen Protein oder in einigen wenigen erfindungsgemäßen Proteinen miteinander kombiniert, daß Antikörper der häufigsten, besser aller, Subtypen einer Erregergattung erkannt werden. Die Antigen-Epitop-Sequenzen können beispielsweise repetitive Sequenzelemente aus gleichen oder verschiedenen HIV Subtypen sein. Bevorzugt ist es allerdings, wenn die Antigen-Epitop-Sequenzen Sequenzen aus verschiedenen HIV Genen und/oder Stämmen und/oder Subtypen sind.

[0020] Grundsätzlich kann die Brückenverbindung aus einer beliebigen Sequenz gebildet sein, wobei die Brückenver-

bindung beispielsweise ein Sequenzelement aus gp120 ist. Bevorzugt ist es, wenn Sequenzen, welche im Blut enthaltene Antikörper unspezifisch binden, deletiert sind. Dies gilt sowohl bezüglich der Brückenverbindung als auch der Antigen-Epitop-Sequenzen.

[0021] Die Erfindung betrifft weiterhin eine Verwendung erfindungsgemäßer Proteine zur Herstellung eines Immobilisats zur Detektion von Antikörpern, wobei zunächst das Protein in Lösung hergestellt wird, wobei dann das Protein über zumindest eine Bindungsstelle an eine Festphase gebunden wird und wobei optional die Festphase mit dem daran gebundenen Protein zumindest einer Spülverfahrensstufe und/oder Blockierungsverfahrensstufe unterworfen wird, sowie eine Verwendung eines erfindungsgemäßen Proteins zur Herstellung eines HIV Tests, wobei ein erfindungsgemäßes Immobilisat hergestellt wird, wobei dieses Immobilisat in ein Gehäuse eingesetzt wird und wobei eine Detektorlösung entweder in einer Reaktionszone des Immobilisats eingebracht ist oder separat zur Aufbringung auf das Immobilisat beigelegt wird.

[0022] Die Erfindung betrifft weiterhin ein Polynukleotid, insbesondere cDNA, codierend für ein erfindungsgemäßes Protein, einen Expressionsvektor, vorzugsweise Plasmid, enthaltend eine Polynukleotid-Sequenz codierend für ein erfindungsgemäßes Protein, und eine Zelle (wobei menschliche embryonale Stammzellen und menschliche Keimbahnzellen ausgeschlossen sind), welche mittels eines erfindungsgemäßen Expressionsvektors transformiert ist.

[0023] Die Erfindung betrifft schließlich ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Proteins, wobei die Antigen-Epitop-Sequenzen und die Brückensequenzen ausgewählt werden und die Ordnung der Aneinanderreihung definiert wird, wobei für die Antigen-Epitop-Sequenzen und die Brückensequenzen codierende DNA in einen Expressionsvektor aneinander in der definierten Weise anschließend und unter üblicher Vorschaltung eines geeigneten Promotors inseriert wird, wobei eine Zelle, vorzugsweise E. coli, mittels des Expressionsvektors transformiert wird, wobei transformierte Zellen selektiert und kultiviert werden, und wobei das von den selektierten Zellen exprimierte Protein isoliert wird.

[0024] Ein erfindungsgemäßer HIV-Test weist im Kern beispielsweise den folgenden Aufbau auf: In einer Ausführungsform als "flow through" befindet sich ein poröses Material, meist eine Membran, in einer Vorrichtung, beispielsweise einem Kunststoffgehäuse, welche eine Zugriffsöffnung zu der Membran aufweist. An für Flüssigkeiten zugänglichen Oberflächen der Membran ist zumindest ein erfindungsgemäßer Protein Typus immobilisiert. Durch die Zugriffsöffnung wird eine zu testende Probe, beispielsweise Blut, Serum oder Plasma, auf die Membran aufgetragen. U. a. aufgrund von Kapillarkräften dringt die Probe in die Membran ein bzw. tritt durch sie hindurch. Dies kann unterstützt werden beispielsweise durch eine Unterfütterung der Membran mittels eines saugfähigen Materials. Die Probe bzw. darin eventuell enthaltene Antikörper reagieren mit dem Protein. Durch Auftrag einer üblichen Detektorlösung, beispielsweise gefärbte Partikel wie kolloidale Goldpartikel, erfolgt ein visueller Nachweis für die Bindung von Antikörpern an das Protein. Alternativ zur "flow through" Technologie kann mittels einem "lateral flow" Verfahren gearbeitet werden. Hierbei wird ebenfalls eine Membran eingesetzt, die allerdings in lateraler Richtung unterteilt ist in eine Aufbringzone und eine Reaktionszone. Kapillarkraftbedingt wandert die in der Aufbringzone aufgebrachte Probe in die Reaktionszone, in welcher zumindest ein erfindungsgemäßer Protein Typus immobilisiert ist. In der Aufbringzone werden keine erfindungsgemäße Proteine immobilisiert sein, es ist aber durchaus möglich, in der Aufbringzone andere Stoffe, beispielsweise Proteine, zu immobilisieren, welche zu detektierende Antikörper nicht binden, dagegen aber in der Probe unerwünschte Stoffe binden und so abtrennen. Hierdurch wird die Zuverlässigkeit der Antikörper-Detektion beachtlich erhöht, da ggf. unerwünschte Wechselwirkungen aufgrund anderer Blutbestandteile ausgeschaltet werden können. Die Reaktionszone kann eine Detektorsubstanz bereits enthalten, es kann aber auch vorgesehen sein, daß in der Detektorzone separat ein Auftrag von Detektorlösung erfolgt.

[0025] Die Erzeugung einer Gesamtsequenz aus Antigen-Epitop-Sequenzen und zwischengeschalteten Brückenverbindungen, welche geladen sind, beispielsweise positiv geladen sind, hat im übrigen auch besondere präparative Vorteile. Wenn ein solches Protein gentechnisch hergestellt wird durch Expression in einer Zelle, so ist zunächst eine Aufreinigung des Proteins aus einem Zellextrakt zweckmäßig. Die Ladungen der Brückenverbindungen erlauben nunmehr eine besonders effektive und einfache Reinigung auf sehr hohe Reinheitsgrade in einer Ionenaustauscherchromatographie, da der isoelektrische Punkt extrem hoch ist. Mit einer solchen Aufreinigung eines gentechnisch hergestellten erfindungsgemäßen Proteins vor einer Immobilisierungsverfahrensstufe wird somit auch ein hinsichtlich gebundenen Proteins besonders reines Immobilisat erhalten. Dies erhöht letztendlich die Zuverlässigkeit eines Testsystems in beachtlichem Maße.

#### Definitionen

[0026] Der Begriff des HIV-Tests bezeichnet eine Nachweismethode zur Detektion von HIV-Antikörpern in Körperbestandteilen, insbesondere Körperflüssigkeiten. Körperflüssigkeiten sind beispielsweise Blut, Serum, Plasma, Speichel, Harn oder Liquor.

[0027] Der Begriff des Protein umfaßt im Rahmen der Erfindung Verbindungen, die natürliche oder nicht-natürliche Aminosäuresequenzen enthalten. Ein Protein kann synthetisiert oder jedenfalls hinsichtlich der Aminosäuresequenzen isoliert sein. Insofern umfaßt der Begriff des Proteins auch Peptide. Ein Protein muß nicht notwendigerweise ausschließlich aus Aminosäuren gebildet sein. Insbesondere die Brückenverbindung kann anders als aus Aminosäuren aufgebaut sein.

[0028] Als Antikörper ist bezeichnet eine durch einen Organismus natürlicherweise in Verfolg einer Infektion durch Immunreaktion gebildete Substanz, welche an den Erreger der Infektion oder Bestandteilen hiervon spezifisch zu binden vermag.

[0029] Als Antigen ist bezeichnet, eine Substanz, welche spezifisch an einen Antikörper zu binden vermag. Antigen und Antikörper sind einander zugeordnet nach Maßgabe des zu detektierenden Antikörpers bzw. der zu detektierenden Antikörper.

[0030] Eine Antigen-Epitop-Sequenz bezeichnet eine Aminosäuresequenz, gebildet aus natürlichen und/oder nicht natürlichen Aminosäuren, die einerseits chemisch bindungsfähig an einen zugeordneten Antikörper ist und andererseits

eine solche Sekundär- und/oder Tertiärstruktur aufweist, daß die rein chemische Bindung auch sterisch, i. e. nach dem "Schlüssel/Schloß-Prinzip", ermöglicht ist.

[0031] Der Begriff der Immobilisierung bezeichnet die Bindung einer Substanz aus der Flüssigphase an einer Feststoffoberfläche. Der Begriff der Bindung umfaßt die Chemisorption, die ionische Bindung, die kovalente Bindung sowie Zwischenformen solcher Bindungen.

[0032] Eine Brückenverbindung ist eine typischerweise oligomere Verbindung, deren Art der Monomere, deren Reihenfolge bzw. Sequenz und deren räumliche Ausrichtung, einschließlich eventueller interner oder externer Vernetzung, definiert ist. Insbesondere definiert sind Positionen der Enden der Brückenverbindung untereinander. Hierbei muß u. U. aber auch die jeweilig angeschlossene bzw. anzuschließende Antigen-Epitop-Sequenz sowie die gegenüberliegende Brückenverbindung berücksichtigt werden, wenn die Anzahl der Freiheitsgrade der Brückenverbindung eine hinreichend eindeutige Definition der räumlichen Stellung der Enden nicht ohne weiteres zuläßt. Eine Brückenverbindung ist nicht notwendigerweise eine artifizielle Sequenz bzw. eine artifiziell zwischen zwei Antigen-Epitop-Sequenzen eingefügte Sequenz. Es kann sich auch um eine native Sequenz zwischen zwei natürlicherweise beabstandeten Antigen-Epitop-Sequenzen handeln, wobei eine oder mehrere Aminosäuren auch ausgetauscht sein können.

[0033] Eine Bindungsstelle bezeichnet im Rahmen der Terminologie der Patentansprüche eine reaktive Gruppe der Brückenverbindung, mittels welcher eine Immobilisierung an der Festphase erreichbar ist.

[0034] Exponieren einer Antigen-Epitop-Sequenz bezeichnet die Einstellung der Sekundär- und/oder Tertiärstruktur der Sequenz so, daß eine Bindung an den Zielantikörper erfolgen kann. Insbesondere meint dies daher die Faltung im Bereich der Antigen-Epitop-Sequenz. Die Faltung kann auch unter Einbeziehung der Ausbildung von Disulfidbrücken erfolgen. Die Faltung führt in der Regel zur Ausbildung eines spezifischen Loops. Eine falsche Faltung führt zu einem falschen Loop. Eine falsche Faltung kann erfolgen, wenn die Enden einer Antigen-Epitop-Sequenz in ungeeigneter Weise räumlich zueinander stabilisiert sind.

[0035] Mit dem Merkmal der Brückenverbindung wird letztendlich erreicht, daß die Teile von zwei Brückenverbindungen, welche zwischen zwei benachbarten Bindungsstellen liegen, die Enden der zwischengeschalteten Antigen-Epitop-Sequenz so stabilisieren, daß eine gewünschte Faltung eingestellt wird. Wesentlich ist hierbei, daß die beiden Bindungsstellen geometrische Fixpunkte sind aufgrund der Bindung an der Festphase. Selbstverständlich können zwischen dem Ende einer Brückenverbindung und der daran angeschlossenen Antigen-Epitop-Sequenz nicht-funktionelle Sequenzen zwischengeschaltet sein, solange dies die vorstehend beschriebenen Zusammenhänge nicht berührt.

[0036] Eine Brückensequenz ist eine Brückenverbindung, welche aus mehreren natürlichen und/oder nicht-natürlichen Aminosäuren gebildet ist.

[0037] Der Ausdruck der verschiedenen Antikörper meint Antikörper unterschiedlichen Typus bzw. unterschiedlicher Struktur. Entsprechendes gilt im Zusammenhang mit Genen, Stämmen, Subtypen und dergleichen.

[0038] Der Begriff der Spezifität bezeichnet die Fähigkeit einer Substanz, aus einer Anzahl gebotener Wechselwirkungsmöglichkeiten bzw. Reaktionsmöglichkeiten eine ganz Bestimmte oder eine Gruppe von ganz Bestimmten wahrzunehmen. Ein für einen bestimmten Antikörper bzw. eine bestimmte Bindungsstelle eines Antikörpers spezifisches Antigen wird mit anderen, in einer Probe, ggf. nach Abtrennung von der Spezifität störenden Stoffen, vorhandenen Antikörpern, die diese Bindungsstelle nicht aufweisen, keine Reaktion zeigen. Dagegen sind Antigene bzw. Sequenzen, welche eine Mehrzahl verschiedener Antikörper einer Probe binden, unspezifisch.

[0039] Der Begriff der Detektion bezeichnet die Erzeugung eines beliebigen direkt mittels der Sinne oder indirekt mittels physikalisch/chemischer Meßmethoden wahrnehmbaren Detektorsignals, welches seine kausale Ursache in einem Antikörper/Antigen Bindungsereignis hat. Im einfachsten Fall handelt es sich um eine Farbreaktion. Detektionsmethoden für Antikörper/antigen Bindungsereignisse sind dem Fachmann in vielfältiger Weise bekannt und brauchen nicht näher erläutert zu werden.

[0040] Eine Detektorlösung enthält eine oder mehrere Substanzen, die zur Erzeugung eines Detektorsignals nach Maßgabe eines Bindungsereignisses Antikörper/Antigen in der Lage sind.

[0041] Der Ausdruck der Festphase bezeichnet einen Festkörper mit einer für Bindungsstellen bindungsfähigen Oberfläche.

[0042] Eine Spülverfahrensstufe umfaßt das Spülen eines erzeugten Immobilisats, i. e. einer Festphase mit daran gebundenem Protein, mit einer Lösung, welche schwach gebundene Proteine und/oder andere Substanzen von der Oberfläche der Festphase entfernt.

[0043] Eine Blockierungsverfahrensstufe umfaßt das Spülen eines Immobilisats mit einer Lösung, welche eine oder mehrere Substanzen enthält, die nicht in Bindung mit Protein gegangene Bereich der Oberfläche der Festphase absättigt, i. e. für die Bindung anderer Substanzen direkt an der Oberfläche der Festphase, blockiert.

#### Ausführungsformen der Erfindung

[0044] Im Folgenden werden lediglich beispielhaft nicht beschränkende Ausführungsformen der Erfindung näher erläutert.

#### Beispiel 1

[0045] Im Folgenden werden Beispiele für artifizielle Brückenverbindungen gegeben, welche im Rahmen eines erfindungsgemäßen Proteins zum Nachweis von HIV-Antikörpern einsetzbar sind.

[0046] Die Brückenverbindung 1 kann die folgende Sequenz aufweisen:

GKR--K-RK-KR--RRG

wobei "-" für eine oder mehrere beliebige Aminosäuren steht. Ein Beispiel für eine solche Brückenverbindung ist:

GKRAHKSRRKHNRYKRHIRRG

[0047] Die Brückenverbindung 2 kann die folgende Sequenz aufweisen:



G-KK-RR-KGK-RR-**G**

wobei "-" für eine oder mehrere beliebige Aminosäuren steht. Ein Beispiel für eine solche Brückenverbindung ist:

GSKKARRIKGKMRRLLKKVG

[0048] Die Brückenverbindung 3 kann die folgende Sequenz aufweisen:

5 G-C-K-R-KRKXKRK-K--C-G

wobei "-" für eine oder mehrere beliebige Aminosäuren steht und wobei "X" für D oder E steht. Ein Beispiel für eine solche Brückenverbindung ist:

GVCIKHRYKRKDKRKHKVACIG

[0049] Die vorstehenden und nachfolgenden Buchstaben in Sequenzinformationen basieren auf dem Single Letter Code.

#### Beispiel 2

[0050] Im Folgenden wird eine native Brückenverbindung angegeben, welche für ein erfindungsgemäßes Protein zum Nachweis von HIV-Antikörpern geeignet ist.

GVA-K-KRR--REKRAVG

wobei "-" für eine beliebige Aminosäure steht. Diese Brückenverbindung stammt aus dem HIV-1 Envelope Gen.

#### Beispiel 3

[0051] Im Folgenden werden erfindungsgemäße Proteine unter Verwendung von Brückenverbindungen u. a. aus den Beispielen 1 und/oder 2 näher beschrieben. Die Tabelle 1 gibt Möglichkeiten der Deletion und/oder Einfügung von Brückenverbindungen in Sequenzen mit Antigen-Epitopen wieder. Geeignete Sequenzen ID I bis ID VI mit Antigen-Epitopen sind in der Fig. 1a-f wiedergegeben, wobei es sich um vollständige Sequenzen von HIV-Proteinen handelt (wobei allerdings für die Erfindung nicht notwendigerweise mit vollständigen Sequenzen als Ausgangssequenzen gearbeitet werden muß).

[0052] Die Tabelle 1 ist so zu lesen, daß in der linkesten und zweitlinkesten Spalte ein zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Proteins geeignetes Ausgangsprotein, ID I bis ID VI, wiedergegeben ist. Die weiteren Spalten geben an, ob und wo welche Deletionen und/oder Insertionen mit Brückenverbindungen, beispielsweise gemäß der Tabelle 2, in dem Ausgangsprotein einfügbar sind, um ein erfindungsgemäßes Protein zu erhalten. In der Tabelle 2 sind: ID 1 bis 3 künstliche Brückenverbindungen, ID 4 eine natürliche Brückenverbindung (aus Übergang gp120/gp41 in env), ID 5 bis 8 HIV-1 O-Sequenzen, ID 9 bis 12 Gnnan-Region aus HIV-2 und ID 13 bis 36 V3-loop Sequenzen aus HIV-1 (Konsensussequenzen der jeweiligen Subtypen und diesen ähnliche Sequenzen, auch aus Subtyp O).

[0053] Beispielsweise wird ein erfindungsgemäßes Protein erhalten, wenn in pol 2, welches 289 Aminosäuren aufweist, an die Position 31 entweder die Brückenverbindung 1 oder die Brückenverbindung 2 aus Tabelle 2 eingefügt wird, nicht jedoch die Brückenverbindung 3. Es ergeben sich letztendlich die in der Tabelle 1 angegebenen uneingeschränkten Kombinationsmöglichkeiten.

[0054] Aus den graphischen Übersichten der Fig. 1a-f gehen Deletionen und mögliche Einfügestellen der Tabelle 2 ebenfalls hervor. In den Sequenzen entspricht das Symbol "+1/2/3+" der Insertion der Brückenverbindung 1, 2 oder 3. "+1/2+" steht also für eine Insertion einer der Brückenverbindungen 1 oder 2.

#### Beispiel 4

[0055] In der Fig. 2 sind Sequenzen Seq. ID A bis E dargestellt, wobei A bis D erfindungsgemäße Proteine sind, E jedoch ein nicht erfindungsgemäßes Protein ist. In den Sequenzen A bis D sind Modifikation so ausgeführt, daß zwischen den Antigen-Epitop Sequenzen geeignete Brückenverbindungen entstehen. Dagegen findet in E keine hinreichende Präsentation von Antigen-Epitop Sequenzen statt. In der Fig. 3a/b sind die Strukturen der Proteine C bis E dargestellt, wozu im einzelnen auf die folgenden Beispiele verwiesen wird.

#### Beispiel 5

[0056] In diesem Beispiel wird die Herstellung eines erfindungsgemäßen Proteins beschrieben, nämlich von p31  $\Delta$ 100/40, 140/23, 163/14  $\Omega$ 31/2, 100/3

#### Lesart

$\Delta$ X/Y (z. B.  $\Delta$ 100/76): Hinter der Aminosäure an Position 100 sind 76 Aminosäuren deletiert.

$\Omega$ X/Y (z. B.  $\Omega$ 30/2): Hinter der Aminosäure 30 ist die Brückenverbindung 2 insertiert

#### Teilschritt 1

[0057] Das Fragment 1 wird mittels der PCR-Technologie gewonnen. Als Primer dienen für die Amplifikation die Oligonukleotide

5'-ATATGGCATATGTTTTTAGATGGAATAGATAAGGCC-3' und

5'-TATAGGGCCAGGTGGCAGGTAAAA-3', als Template wird das HIV-pol Gen verwendet. Die PCR-Reaktion wird nach üblichem Protokoll durchgeführt. Das gewünschte PCR-Produkt (ca. 110 bp) wird isoliert und einer Restriktion mit Apal und NdeI unterworfen.



5'-CTAGGCAGGCCA...TATGCTTCCGACGATCGCGTTCGCTTGTAGCGGT...GATG-3')  
werden bei 100°C kurz denaturiert, im linear abfallenden Temperaturgradienten miteinander hybridisiert und das Doppelstrangprodukt isoliert.

## Fragment 4

## Brückenverbindung 3, synthetisch

SphI

CATGCTTCCGACGATCGCGTTCGCTTGTAGCGGT...GATG-3')

10 A C I K H R Y K R R D R R K H K V A C I G  
GTATTTTCTTGGATGTTTCTGCGTTAGCAGCGTTTCTGTTTCTATTCATCGGACGGATC

## Teilschritt 5

15 [0061] Das Fragment 5 wird mittels der PCR-Technologie gewonnen. Als Primer dienen für die Amplifikation die Oligonukleotide  
5'-ATTATCCTAGGTCAAATGGCAGTATTCATCCAC-3' und  
5'-TATAGGATCCTAATCCTCATCCTGTCTACTTGC-3', als Template wird das HIV-pol Gen verwendet. Die PCR-Reaktion wird nach bekanntem Protokoll durchgeführt. Das gewünschte PCR-Produkt (360 bp) wird einer Restriktion mit  
20 AvrII und BamHI unterworfen und anschließend isoliert.

## Fragment 5

## Epitop 3, PCR

AvrII

TATAGGATCCTAATCCTCATCCTGTCTACTTGC-3')

30 CAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCA  
C I G Q M A V F I H N F K P K G G I G G Y S A

GGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAA  
G E R I V D I I A T D I Q T E E L Q H Q

35 ATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAAATCCACTTTGGAAA  
I T K I Q N F R V Y Y F D S P N P L W K

GGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGGGGAGTAGTAATACAAGATAATAGTGAC  
G F A K L L W K G E G A V V I Q D N S D

40 ATAAAAGTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAGATCATTAGGGATTATGGAACAGATGGCA  
I K V V P F F K A K I I R D Y G H Q M A

GGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAG  
G D D C V A S F Q D E D \*

45 CCACTACTAACACACCGTTCATCTGTCTACTCCTAATC

BamHI

## Teilschritt 6

50 [0062] Ein geeigneter Expressionsvektor wird mit NdeI und BamHI geschnitten und das Vektorfragment isoliert.

## Teilschritt 7

55 [0063] Das aufgereinigte Vektorfragment und die jeweils isolierten Teilfragmente werden mit Hilfe von Ligationsreaktionen miteinander verknüpft.

## Teilschritt 8

60 [0064] Geeignete E. coli Zellen werden mit den Ligationsprodukten transformiert und selektioniert.

## Teilschritt 9

65 [0065] Aus erhaltenen Kolonien wird die Plasmid-DNA isoliert und auf Vorhandensein, Anordnung und Orientierung der Teilsequenzen mit den Enzymen NdeI, ApaI, NgoMIV, SphI, AvrII und BamHI in verschiedenen Kombinationen geprüft. Plasmid-DNA mit positivem Ergebnis wird zur Bestätigung sequenziert.

p31 nativ

p31Δ100/40, 140/23, 163/14 Δ31/2, 100/3

Frg. 1 Frg. 2 Frg. 3 Frg. 4 Frg. 5  
 NdeI ApaI NgoMIV SphI AvrII BamHI

## Gesamtnukleotidsequenz:

CATATGTTTTTAGATGGAATAGATAAGGCCCAAGATGAACATGAGAAATATCACAGTA  
 ATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTTTAACTGCCACCTGGGCCCAAAAAGGCCCGTCG  
 CATCAAGGGCAAATGCGACGGGTGAAGAAAGCCGGCGTAGTAGCAAAAGAAATAGTA  
 GCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGAGAAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTA  
 GTCCAGGAATATGGCAACTAGATTGTACACATTTAGAAGGAAAAGTTATCCTGGTAGC  
 AGTTCATGTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAGTTATTCCAGCAGAAACAGGGCAG  
 GAAACAGCATATGGAGCATGCATCAAACACCGCTACAAGCGACGCGATCGTCGGAAGC  
 ATAAAGTGGCCTGCCTAGGTCAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGG  
 GGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATA  
 CAAACTAAAGAATTACAAAACAAATTACAAAATTTCAAATTTTTCGGGTTTATTACA  
 GGGACAGCAGAAATCCACTTTGGAAAGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGG  
 GGCAGTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAAAGTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAG  
 ATCATTAGGGATTATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGG  
 ATGAGGATTAGGATCC

## Gesamtaminosäuresequenz:

MFLDGLDKAQDEHEKYHSNWRAMASDFNLPPGPKKARRIKGKMRRVKKAGVVAKEIVA  
 SCDKQCQLKGEAMHGQVDCSPGINQLDCTHLEGVILVAVHVASGYIEAEVIPAETGQE  
 TAYGACIKHRYKKRDRKHKVACIGQMAVFIHNFRRKGGIGGYSAGERIVDIATDIO  
 TKELQKQITKIQNFRVYYRDSRNFLLWKGPALKLLWKGEHAVVIQDNSDIKVVPKKANI  
 IRDYGKQMGDDCVASRQDED\*

[0066] Die Expression eines erfindungsgemäßen Proteins wird wie folgt durchgeführt. Nachdem die kodierende Nukleinsäure für das zu exprimierende Protein hergestellt und über Restriktionsschnittstellen in einen handelsüblichen Vektor eingebaut wurde, erfolgt eine Transformation des Plasmids in eine handelsübliche E. coli-Zelle. Nach einer Inokulierung eines Mediums (z. B. LB-Medium) mit dem Transformationsansatz erfolgt die Anzucht der Zellkultur durch Inkubation bei einer optimalen Temperatur (z. B. 37°C). Die Protein-Expression wird durch eine Zugabe von Isopropyl β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und durch eine Fortführung der Inkubation erreicht. Nach dem Ernten der E. coli-Zellen durch Zentrifugation wird eine Zellyse mit einem Lysispuffer (z. B. einem Guanidinhydrochloridhaltigen Puffer) durchgeführt.

[0067] Die Reinigung des Proteins kann über herkömmliche Chromatographiemethoden (z. B. Ionenaustauscherchromatographie und Gelchromatographie) erfolgen, wobei der durch Einfügen positiv geladener Sequenzen erhöhte isoelektrische Punkt der Proteine vorteilhaft benutzt werden kann, die Proteine über Kationenaustauscherchromatographie stark anzureichern. Üblicherweise werden die chromatographischen Trennungen mit Hilfe von Chromatographiesäulen, in die das Material eingebracht wird, durchgeführt. Falls die Proteine mit einem "tag" (z. B. einem N- oder C-terminalen His6-Peptid, einem "flag-tag" oder myc-Epitop) versehen wurden, können sie durch Verwendung einer Affinitätschromatographie gereinigt werden, wobei das jeweilige Protein über den "tag" an das entsprechende Affinitätschromatographiematerial (z. B. für His6-tag an Ni-NTA-Material) gebunden wird. Nachdem das Material mit entsprechenden Waschpuffern mehrmals gewaschen wurde, wird das gewünschte Protein mit Hilfe von mindestens einem Elutionspuffer (z. B. durch einen Puffer mit deutlich erhöhten oder erniedrigten pH-Wert) von dem Material abgetrennt. Abschließend werden die Eluate noch mehreren Dialysesritten unterzogen, um die Weiterverwendung des Proteins zu erlauben.

## Beispiel 6

[0068] In diesem Beispiel wird die Herstellung eines erfindungsgemäßen Immobilisats beschrieben. Das gereinigte Protein wird in geeigneter Weise mit einer wäßrigen Lösung von 100 mM NaCl und 0,4–0,8% SDS verdünnt. Von dieser Lösung werden mit Hilfe eines BioDot-Gerätes (Cambridge, England) 0,5 µl auf eine Nitrozellulosemembran aufgebracht, so daß sich auf einem Fleck mit 3–4 mm Durchmesser 250 ng Protein befinden. Die Membran wird nach Aufbringen des Proteins für mindestens eine Stunde getrocknet, bevor die Nachweisreaktion durchgeführt wird.

[0069] Es wird ein Immobilisat erhalten, bei welchem die Anordnung und Faltung des Proteins in einer Weise erfolgt ist, die schematisch in der Fig. 3a dargestellt ist. Die Epitope sind durch eine positiv geladene Peptidsequenz getrennt, was eine Anheftung an die Membran und eine richtige Faltung der Epitope (unterstrichene Sequenzbereiche) erlaubt.

[0070] Zu der in Fig. 3a dargestellten Faltung mag angemerkt werden, daß möglicherweise nicht alle Proteinmoleküle, die auf die feste Phase aufgebracht werden, sich in der skizzierten Weise falten werden. Ein Teil der Moleküle kann, verursacht durch die Lyse der Zellen und die anschließende Reinigungsprozedur in ungeordnetem (denaturiertem) Faltungszustand vorliegen. Für den Zweck der Erfindung ist aber ausreichend, wenn bei einem erfindungsgemäß konstruierten Protein die Wahrscheinlichkeit einer für die Bindung von Antikörpern geeigneten Faltung, induziert durch die durch den Einbau der Brückenverbindungen ermöglichte optimale Anheftung auf der festen Phase, gegenüber einem keine Brückenverbindungen enthaltenden Protein deutlich erhöht ist. Durch diese erhöhte Wahrscheinlichkeit der "richtigen" Faltung wird die Möglichkeit der Bindung der Antikörper insgesamt stark verbessert und damit die Erhöhung der Sensitivität des gesamten Nachweisverfahrens gewährleistet.

## Beispiel 7

[0071] Ein Immobilisat aus Beispiel 6 wurde mit Seren aus diversen HIV positiven Patienten beschickt und die Reaktion wurde mittels einer Detektorlösung geprüft. Es zeigte sich in allen Fällen eine für die Bindung Antikörper/Antigen spezifische Farbreaktion. Falsch negative Ergebnisse wurden nicht erhalten. Versuche mit Seren von HIV negativen Personen ergaben, daß keine einzige falsch positive Anzeige erhalten wird.

## Beispiel 8

[0072] In diesem Vergleichsbeispiel wurde mit einem Protein env 4 (ID E) ein Immobilisat entsprechend der Verfahrensweise nach Beispiel 6 hergestellt. Der Unterschied besteht ausweislich einer vergleichenden Betrachtung der Fig. 3a und 3c jedoch darin, daß zwischen den linksseitig liegenden Epitopen keine positiv geladene Brückenverbindung eingerichtet ist. Man erkennt weiterhin, daß dadurch die beiden linksseitigen Epitope nahe beieinander liegen und so gefaltet werden – unter Ausbildung von die Antigenizität zerstörenden Disulfidbrücken –, daß eine Bindung eines Antikörpers nicht erfolgen kann.

[0073] Mit gleicher Proteinmenge, wie in Beispiel 7 wurden wiederum Tests mit Seren diverser HIV positiver Patienten durchgeführt. Durchweg wurde praktisch keine Reaktion angezeigt, wurden also regelmäßig falsch negative Ergebnisse erhalten.

## Beispiel 9

[0074] In diesem Beispiel wird anhand der Fig. 3b ein erfindungsgemäßes Protein (ID D) bzw. Immobilisat mit repetitiven Sequenzelementen aus verschiedenen HIV-Subtypen schematisch dargestellt (auch gleiche sind möglich). Dieses erfindungsgemäße Protein ist dabei nur aus V3 Loops verschiedener HIV-Subtypen gebildet, die durch ein positiv geladenes Sequenzelement aus gp120 getrennt sind.

## Beispiel 10

[0075] Ein erfindungsgemäßer Schnelltest ist wie folgt aufgebaut: Ein Immobilisat gemäß Beispiel 6 wird in einem Kunststoffgehäuse unter einer Zugriffsöffnung so positioniert und fixiert, daß zumindest ein Teilbereich des Immobilisats dem Zugriff unterliegt. Das Immobilisat ist dabei mit einer saugfähigen Unterlage, beispielsweise Watte, unterfüttert. Zu dem Schnelltest gehört eine separat abgepackte Detektorlösung.

[0076] Der Nachweis von an das Antigen gebundenen Antikörpern kann mit Hilfe einer Detektionslösung erfolgen, die ein Konjugat aus Protein A mit kolloidalem Gold enthält. Die Verwendung von solchen Konjugaten in immunologischen Testverfahren ist allgemein bekannt und in der Literatur beschrieben. Dieses Konjugat kann beispielsweise wie in US 5,541,059 beschrieben hergestellt werden durch Mischen von 100 ml einer kolloidalen Gold-Lösung (kommerziell erhältlich) mit 100 ml einer 0.006 mg/ml enthaltenden Lösung von Protein A (Protein A ist als sowohl in lyophilisierter Form als auch als Lösung kommerziell erhältlich). Alternativ kann ein Protein A-Gold-Konjugat auch kommerziell erworben werden.

[0077] Die Bindung des Konjugats an die gebundenen Antikörper kann visuell detektiert werden. Im vorliegenden Beispiel ergibt sich bei Vorhandensein von gebundenen Antikörpern ein rötlicher Fleck.

[0078] Alternativ zu den Konjugaten mit kolloidalem Gold kann auch eine Farbstoffsuspension verwendet werden, wobei Protein A an einen wasserunlöslichen Farbstoff adsorbiert wird.

[0079] Ein Schnelltest wird wie folgt durchgeführt. Einem Probanden wird durch Nadelstich eine kleine blutende Wunde zugefügt. Der entstehende Blutropfen wird in einer kleinen Kapillare aufgenommen. Die Kapillare mit dem Blut wird dann in einem Behälter mit einem geeigneten Lösungsmittel, beispielsweise physiologische Kochsalzlösung, zusammengegeben und solange geschüttelt, bis Blut und Lösungsmittel sich vermischt haben. Der Inhalt des Behälters wird dann über die Zugriffsöffnung auf das Immobilisat gegeben. Sodann wird die Detektorlösung aufgegeben und visu-

ell beobachtet, ob eine Verfärbung des durch die Zugriffsöffnung sichtbaren Immobilsats erfolgt. Verfärbung bedeutet, daß HIV-Antikörper in dem Blut des Probanden vorliegen. Tritt keine Verfärbung ein, so ist das Ergebnis dagegen negativ.

## Patentansprüche

5

1. Protein mit mehreren Antigen-Epitop-Sequenzen für Antikörper, wobei das Protein an einer Festphase über zumindest eine Bindungsstelle immobilisiert ist, und wobei die Antigen-Epitop-Sequenzen über Brückenverbindungen mit der Maßgabe beabstandet sind, daß nach Bindung der Bindungsstelle an der Festphase die Antigen-Epitop-Sequenzen für eine Bindung der zugeordneten Antikörper aus der flüssigen Phase exponiert sind. 10
2. Protein nach Anspruch 1, wobei eine Brückenverbindung durch Insertion von Brückensequenzen zwischen zwei Antigen-Epitop-Sequenzen und/oder Deletion einer Teilsequenz zwischen zwei in einer Gesamtsequenz angeordneten Antigen-Epitop-Sequenzen gebildet sind.
3. Protein nach Anspruch 1, wobei die Brückenverbindung durch Fusion einer Brückensequenz mit zwei Antigen-Epitop-Sequenzen gebildet ist. 15
4. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Brückenverbindung positiv geladene Bindungsstellen zur Bindung an eine negativ geladene Festphase, vorzugsweise eine Membran, aufweist.
5. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Antigen-Epitop-Sequenzen verschiedene Antikörper binden.
6. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Antigen-Epitop-Sequenzen repetitive Sequenzelemente aus gleichen oder verschiedenen HIV-Subtypen sind. 20
7. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Antigen-Epitop-Sequenzen Sequenzen aus verschiedenen HIV-Genen und/oder Stämmen und/oder Subtypen sind.
8. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Antigen-Epitop-Sequenzen Sequenzen aus einem einzigen HIV-Subtyp sind. 25
9. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Brückenverbindung ein Sequenzelement aus gp120 ist.
10. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei Teilsequenzen, welche in Körperflüssigkeiten enthaltene Antikörper unspezifisch binden, deletiert sind.
11. Verwendung eines Proteins nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Herstellung eines Immobilisats zur Detektion von Antikörpern, wobei zunächst das Protein in Lösung hergestellt wird, wobei dann das Protein über zumindest eine Bindungsstelle an eine Festphase gebunden wird. 30
12. Verwendung eines Proteins nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Herstellung eines HIV-Tests, wobei ein Immobilisat nach Anspruch 11 hergestellt wird, wobei dieses Immobilisat in ein Gehäuse eingesetzt wird und wobei eine Detektorlösung entweder in einer Reaktionszone des Immobilisats eingebracht ist oder separat zur Aufbringung auf das Immobilisat beigefügt wird. 35
13. Polynukleotid codierend für ein Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 10.
14. Expressionsvektor enthaltend eine Polynukleotid-Sequenz kodierend für ein Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 10.
15. Zelle, welche mittels eines Expressionsvektors nach Anspruch 14 transformiert ist.
16. Verfahren zur Herstellung eines Proteins nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Antigen-Epitop-Sequenzen und die Brückensequenzen ausgewählt werden und die Ordnung der Aneinanderreihung definiert wird, wobei für die Antigen-Epitop-Sequenzen und die Brückensequenzen codierende DNA in einen Expressionsvektor aneinander in der definierten Weise anschließend inseriert wird, wobei eine Zelle mittels des Expressionsvektors transformiert wird, wobei transformierte Zellen selektiert und kultiviert werden, und wobei das von den selektierten Zellen exprimierte Protein isoliert wird. 40 45

---

Hierzu 7 Seite(n) Zeichnungen

---

50

55

60

65

Fig. 2

4. Beispielproteine aus der Permutationstabelle (A, B und C) und andere (D und E)

A. pol 2  $\Delta$  100/40, 140/23, 163/14  $\Omega$  31/2, 100/3 (253 AS)

MFLDGIDKAQDEHEKYHSNWRAMASDFNLPPGPKKARRIKGMRRVKKAGVVAKEIVASCDKQLKGEAMHGQVDCSPGIWQLDCTHLEGVILVAVHV  
ASGYIEAEVIPAETGQETAYGACIKHRYKRRDRRKHKVACIGQMAVFIHFKRKGIGYSAGERIVDIIATDIQTKELOQITKIQFRVYYRDSRNP  
LWKGPAKLLWKGEAVVIQDNSDIKVPPRRKAKIIRDYGKQMGDDCVASRQDED

B. env 2  $\Delta$  47/25, 210/5, 215/25, 240/23, 286/58, 344/48  $\Omega$  215/11 (232 AS)

MGSDMRDNWRSELYKYKVVVIEPLGVAPTAKARRVQREKRAVGIGSRQLLSGIVQQNNLLRAIEAQHLLQLTVWGIGKQLQARILAVERYLKDQQL  
GIWCSGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQIWNMTWMEWDREINNYTSLIHSLEESQNOQEKNEQELLELDKWASLWNFNITNLAMEKYLKQDQARLN  
SWGCAFRQVCHDRPEGIEEGGERDRDRSIRLVN

C. env 2  $\Delta$  47/25, 210/5, 215/25, 240/23, 286/58, 344/48  $\Omega$  8/6, 215/11 (254 AS)

MGSDMRDNWQNNQNLNLWGCKGRLVCYTNWRSELYKYKVVVIEPLGVAPTAKARRVQREKRAVGIGSRQLLSGIVQQNNLLRAIEAQHLLQLTVW  
GIKQLQARILAVERYLKDQQLGIWCSGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQIWNMTWMEWDREINNYTSLIHSLEESQNOQEKNEQELLELDKWASLW  
NWFNITNLAMEKYLKQDQARLNSWGCAFRQVCHDRPEGIEEGGERDRDRSIRLVN

D. AS(M) + Seq ID (1+37+24+38+2+37+32+38+3+37+27+38+2+37+25+38+1) (297 AS)

MKRAHKSRIKRVTRRGAVGIGINCTRPNNTRKSVRIGPGQAFYATGDIIGDIRQAHCNIGPTPTGWKKNRRLKGYRRMKKWGAIVGIGINCTRPNN  
NHTRKSIHIGPGAFYATSGDIIIGDIRQAHCNIGPTPTGACVKHRQKRKEKRYKTACVGAIVGIGINCTRPNNTRKSIHILGPGQAFYATGDIIGDI  
RQAHCNIGPTPTGSKKARRIKGMRLKKGAVGIGINCTRPNNNGHTRKSIRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAHCNIGPTPTGKRAVSKRYKRHRRG

E. env 4 (221 AS)

MGSDMRDNWRSELYKYKVVVIEPLGVAPTAKARRVQREALETLNQNNQILNLWGCKGRLICYWGKQLQARILAVERYLKDQQLGIWCSGKLICTT  
AVPWNASWSNKSLEQIWNMTWMEWDREINNYTSLIHSLEESQNOQEKNEQELLELDKWASLWNFNITNLAMEKYLKQDQARLNSWGCAFRQVCHDR  
PEGIEEGGERDRDRSIRLVNGS

Tab. 1

3. Permutationstabelle

Protein	Seq ID	Mögliche Deletionen ( $\Delta$ ) (AS-Position/AS-Anzahl)	Einfügestellen ( $\Omega$ ) von den Inserts (AS-Position/Seq ID)	
			Brückenvbd. 1,2,3 (Seq ID 1-3)	native Brückenvbd. 1 (Seq ID 4) Epitope (Seq ID 5-36)
gag (500 AS)	I.	$\Delta$ 1/131 $\Delta$ 132/27	$\Omega$ 132(1/3)	
		$\Delta$ 159/150 $\Delta$ 309/54	$\Omega$ 249(2/3)	$\Omega$ 249(4)
		$\Delta$ 363/14 $\Delta$ 377/73	$\Omega$ 323(1/2/3)	$\Omega$ 323(4)
		$\Delta$ 450/50	$\Omega$ 450(1/2/3)	$\Omega$ 450(4)
pol 1 (561 AS)	II.	$\Delta$ 1/60 $\Delta$ 61/223	$\Omega$ 61(1/2/3)	
		$\Delta$ 398/29 $\Delta$ 441/120	$\Omega$ 228(1/2/3)	$\Omega$ 61(4)
			$\Omega$ 284(1/2/3)	$\Omega$ 284(4)
			$\Omega$ 436(1/2/3)	$\Omega$ 436(4)
pol 2 (289 AS)	III.		$\Omega$ 535(1/2/3)	$\Omega$ 535(4)
			$\Omega$ 31(1/2)	
		$\Delta$ 100/40 $\Delta$ 140/23	$\Omega$ 100(1/2/3)	$\Omega$ 140(4)
		$\Delta$ 163/14	$\Omega$ 140(2/3)	$\Omega$ 177(4)
env 1 (491 AS)	IV.	$\Delta$ 1/4 $\Delta$ 6/31	$\Omega$ 44(1/2/3)	$\Omega$ 3(14/17/29-36) $\Omega$ 75(13-20/24/27/31) $\Omega$ 136(13-36) $\Omega$ 137(13-25/35) $\Omega$ 213(13-18/23-36) $\Omega$ 392(13-36) $\Omega$ 452(19/21/34)
		$\Delta$ 54/18 $\Delta$ 107/28	$\Omega$ 87(1/2/3)	
		$\Delta$ 136/1 $\Delta$ 148/34	$\Omega$ 160(1/2/3)	
		$\Delta$ 230/20 $\Delta$ 308/82	$\Omega$ 253(1/2/3)	
env 2 (392 AS)	V.	$\Delta$ 489/2	$\Omega$ 417(1/2/3)	$\Omega$ 8(5-8/9/11/12) $\Omega$ 45(9-11) $\Omega$ 161(5/7/8) $\Omega$ 202(6/7) $\Omega$ 214(6-8) $\Omega$ 215(9-12) $\Omega$ 286(10/11) $\Omega$ 344(9-12)
		$\Delta$ 1/46 $\Delta$ 47/25	$\Omega$ 8(1/2)	
		$\Delta$ 142/13 $\Delta$ 156/5	$\Omega$ 112(1/2/3)	
		$\Delta$ 210/5 $\Delta$ 215/25	$\Omega$ 215(1/2/3)	
env 3 (360 AS)	VI.	$\Delta$ 240/23 $\Delta$ 286/58	$\Omega$ 344(1/3)	
		$\Delta$ 344/48		
		$\Delta$ 2/38 $\Delta$ 176/54	$\Omega$ 69(1/2/3)	
		$\Delta$ 257/103	$\Omega$ 176(1/2/3) $\Omega$ 253(1/2/3)	



Tab. 2

2. Aminosäuresequenzen (Single Letter Aminosäurecode) der Insertionen

Seq ID	Aminosäuresequenz	Seq ID	Aminosäuresequenz
1	GKR--K-RK-KR--RRG	20	IRQGIHIGPGRAFFAAW
2	G-KK-RR-KGK-RR-KK-G	21	DVQEMRIGPMAWYSMG
3	G-C-K-R-KRRRRK-K--C-G	22	ICTRRGIRMGPGQVVYATCT
4	GVA--K-KRR---REKRAVG	23	TIVQIKIIGPLAVYSMYG
5	WIQQLRLNLWGCRGKLICYTN	24	TRKSVRIGPGQAFYAT
6	WIQQLLLNLWGCKGRLVCYTN	25	GHTRKSIRIGPGQTFYAT
7	WLQNQQILNLWGCKGRLICYTN	26	NTRQSTHIGPGALYTTKIE
8	WLSQQLLSNLWGCRGKLVCYTN	27	TRKSIHLGPGQAFYATGD
9	AIERYLQDQARLNSWGCTFRQVCH	28	YQTRKSIRIGPGQAFYATGD
10	AMEKYLRLDQAIVNSWGCAFRQVCY	29	TVQEIRIGPMAWYSMGNV
11	AMEKYLKDQARLNSWGCAFRQVCH	30	TRISHTIGPGRVFYRT
12	AI EKYLKHQAQLNAWGCAFRQVCH	31	TRKGIHMGPGQVLYATKP
13	TRKSIHIGPGQAFYATGD	32	HTRKSIHIGPGRAFYATS
14	TRRSISFGIGPGQALYTT	33	TRKSIHIGPGRAFYTTSMQ
15	TRQRTPIGLGQALYTTGQF	34	QTRTSITIGPGQVFYRTE
16	RTVQEIRIGPMAWYSMGA	35	GTRKSVRIGPGQTFYATG
17	TMKRTSIHIGPGQTFYAT	36	TRKGIHIGPGRAFYATG
18	TRRGIPLGPGRAWYATL	37	AVGIGINCTRPNNN
19	DSTRESMRIGPGQAFYATG	38	GDIIGDIRQAHCNIGTPT

Legende: X ≡ D oder E  
"-" ≡ beliebige Aminosäure

Patentanhang

Fig. 1

*Einzelbuchstaben*

1. Aminosäuresequenzen (Single-Letter Aminosäurecode)

Seq ID I.: gag (500 AS)

M-GARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKYKLVHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRIILGQLQPSLQGTSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTK  
EALDKIEEEQNKSKKAAQAAADTGHNSQVSNY-+1/3+-PIVQNIQQQMVHQAISPRTLNANWVV-+EKAFSPEVIMFSAISEGATPQDLNMTL  
NTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIAPGQMPREPRGSDIAGTSTLQEQIGW+2/3+MTNNPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSI  
LDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQ-+SQEVKNWMTETLLV+1/2/3+QANAPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVL-+AEAMSVQ  
TNSATIM-+MQRGNFRNQRKIIVKFCNGKEGHTARNCRAPRKKGCKGEGHQMCKDCTERQANFLGIWPSYKGRPGNFQ-+1/2/3+-SRPEPTAP  
PEESFRSGVETTPPQKQEPIDKELYPLTSLRSLFGNDPSSQ-

Seq ID II.: pol 1 (561 AS)

M-PISPIETVPVKLKPMDGPKVKQWPLTEEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPV-+1/2/3+-FAIKKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFW  
EVQLGIPHPAGLKKKSVTLVDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAFTIPSNNETPGIRYQYNVLPQGWKSPAIQSSMTKILEPFRKQNPINIVYQYMDDL  
YVGSdleIGQHRTKIEELRQHLRWGLTTPDKKHQKEPP+1/2/3+LMMGYELHPDKWTVPQIVLPEKDSWTVDIOKLVGKLNWASQIYPGKVRQL  
CKLL-+1/2/3+RGTKALTEVIPLEEAELELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGGQWYQIYQEPFKNLKTGKYARMRGHTNDVKQLTE  
AVQKITTESIVIWGKTPKFKLPQKET-+WETWTEYWOATWPEWEFVNTPLVLKLW-+YQLEKEPIV+1/2/3+GAETFF-+YVDGAANRETKLGKAGYVT  
NRGRQKVVTLTDTTNQKTELQAIYIALQDSGLEVINIVTDSQYALGIIQAQPDQSESELVNQIIEQLIKKEKVIYA+1/2/3+WVPAHKGIGGNEQVVDKL  
VSAGIRKVL-

Seq ID III.: pol 2 (289 AS)

MFLDGIDKAQDEHEKYHNSWRAMASDFNLPP+1/2/3+VVAKELIVASCDKQLKGEAMHGQVDCSPGIWQLDCTHLEGVILVAVHVASGYIEAEVIPA  
ETGQETAY+1/2/3+-FLKLKLAGRPVKTITHTDNGSNFTSATVKAACWAGIKQEF-+1/2/3+-GIPYNPQSQGVVESMNKELKKI-+GQVRDQAEH  
LKTAV-+1/2/3+QMAVFIHNEFRKKGIGGYSAGERIVDIATDIQTKELOKQITKIQNFRVYRDSRNPWLKGPAPKLLWKGEAVVIQDNSDIKVVPR  
RKAKIIRDYKGQMGAGDDCVASRQDED

Fig. 1

Seq ID IV.: env 1 (491 AS)

M-DG+14/17/29-36+-SH-G-TEKLWTVYGVVWKEATTTLCASDAKAY-DTEVHNV+1/2/3+WATHACVPTD-PNPQEWLVNVTFNFMW  
KND+13-20/24/27/31+MVEQMHEDIISL+1/2/3+WDQSLKPCVKLTPLCVSLKE-CTDLKNDTNTNSSSGRMIMEKGEIKNCS-F+13-36+P+  
13-25/35+NISTSIRGKVQKEYAFFYKLDII+1/2/3+PIDNDTTSYKLTSONTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKTFNGT+13-18  
/23-36+GPCTNVSTVQCTHGIR-PVYSTQLLNGSLAEVV+1/2/3+NFTDNAKTIIVQLNTSVEINCTRPNNNTRKIRIQRGPGRAFT  
IGKIGNMRQAH-CNISRKWNNTLKQIASKLREQFGNKKTIIFKQSSGGDPEIVTHSFNCGGEFFYCNSQTFNFWFNSTWSTEGSNNTGSD-LQ+1  
3-36+TITLPCRKQIINMWQKVGKAMYAP+1/2/3+PISQIRCSSNITGLLLTRDGGNSNESEIFRPGG+19/21/34+GMDRDNWRSELYKYKV  
KIEPLGVAPTAKRRVVQRE-KR-

Seq ID V.: env 2 (392 AS)

M-GSDMRDN+1/2/5-8/9/11/12+WRSELYKYKVVKIEPLGVAPTAKRRVVQREKRAVGIGS-+9-11+-ALFLGLGAAGSTMGAASMTLTVOA-  
RQLLSGIVQQNNLLRAIEAQOHLQLTVWGIKQLOARIL+1/2/3+AVERYLKDQQLGIWCGSKLICCTTAVPWN-ASWSNKSLEQIWN-N-MTWME  
-+5/7/8+WDREINNYTSLIHSLIEESQNOQEKNEQELLELDKWSLWN+6/7+WFNITNL-EFNN+6-8+W+1/2/3/9-12+-WYIKLFIMIVGG  
LVGLRIVFAVLSI-VNRVRQGYSPLSFQTHLPPIRGP-DRPEGIEEGGERDRDRSIRLVN+10/11+-GSLALIWDDLRSCLFSYHRLRDLIIVT  
RIVELLGRRGWEALKYWNLLQYWSQELK+1/3/9-12+-NSAVSLNATAIAVAEGTDRVIEVVQACRAIRHIPRRIRQGLERILL-

Seq ID VI.: env 3 (360 AS)

MM-SSAHRHTRGVFLGLFLATAGSAMGAASLTVSQS-RTLLAGIVQQQQQLLDVVKRQOELLRLTV+1/2/3+WGKNLQARVTAIEKYLODQA  
RLNSWGCAFRQVCHTTVPWVNDSLAPDWDNMTWQEWKQVRYLEANISKSLEQAQIQEKNMYELQKLNWDIFGNWFDLTSMVKN+1/2/3+-YIQYG  
VLIIVAVIALRIVIVVQMLSRKGYRPFVSSPPGYIQQIHKHDRGQ-SPANEETEEDGSGNGDRYWPWP+1/2/3+IAYI-HFLIRQLIRLLTRL  
YSICRDLRSRSLTLQLIYQNLRDWLRLRTAFLOYGCEWIQEAFQAAARATRETLAGACRGLWRVLERIGRGILAVPRRIRQGAETALL-

Legende: - bzw. ~ ≡ Anfang bzw. Ende einer möglichen Deletion

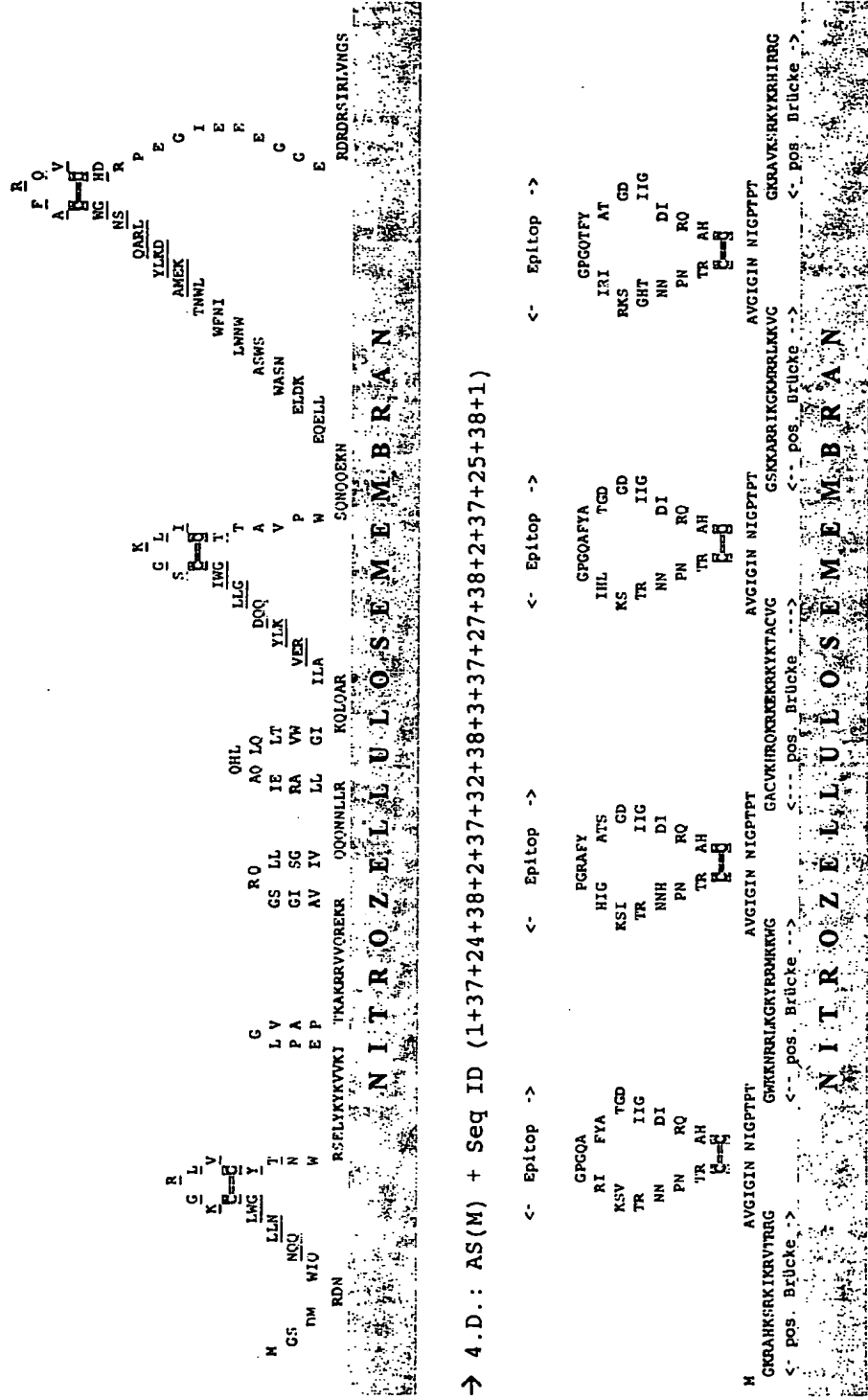
+A/B+ ≡ Mögliche Einfügestellen (Insertionsstellen) einer AS-Sequenz mit der Seq ID A und/oder B

Fig. 3

# 5. Bindung von Proteinen an die Nitrozellulosemembran

A. Positive Beispiele (4.C. und 4.D.):

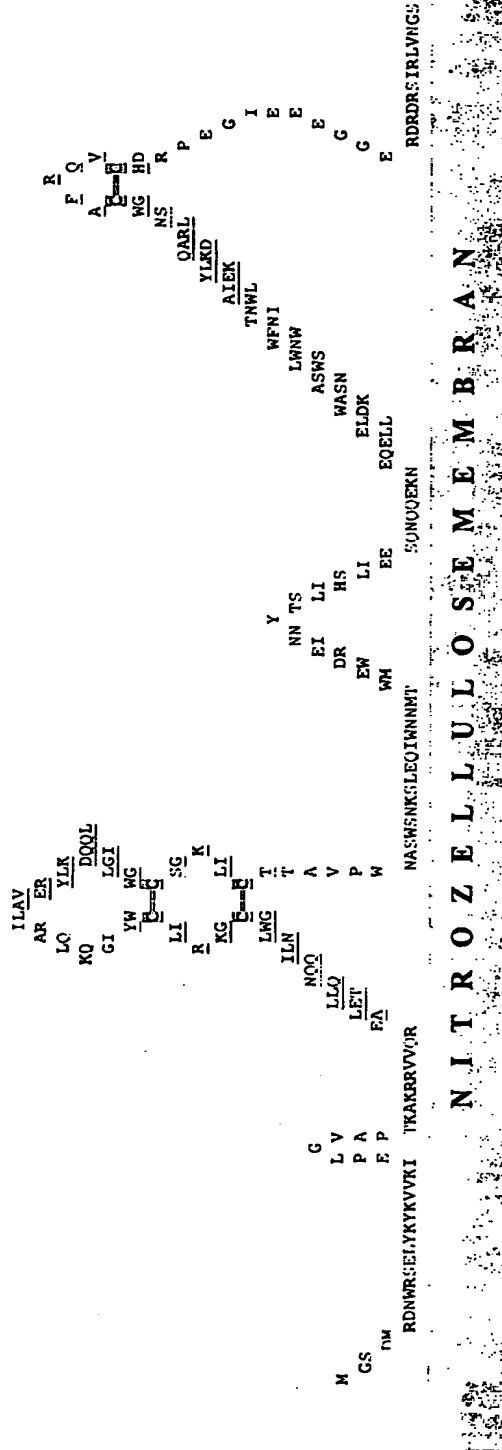
→ 4.C.: env 2 Δ47/25, 210/5, 215/25, 240/23, 286/58, 344/48 Ω8/6, 215/11



→ 4.D.: AS(M) + Seq ID (1+37+24+38+2+37+32+38+3+37+27+38+2+37+25+38+1)

Fig. 3

B. Negatives Beispiel (4.E.): env 4



- Legende:
- Aminosäure in rot ≡ positiv geladene Aminosäure
  - Aminosäure in blau ≡ negativ geladene Aminosäure
  - Aminosäure in grün ≡ polare Aminosäure
  - $\text{C}^{\text{N}}=\text{C}$  ≡ Brückenbindung von zwei Cysteinen

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**